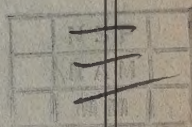
VOLUME 1 1958 N° 3

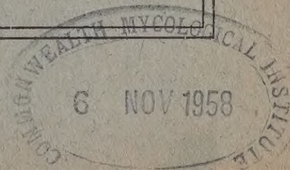
ANNALES
DE L'
INSTITUT PHYTOPATHOLOGIQUE BENAKI

NOUVELLE SÉRIE





KIPHISSIA-ATHÈNES
GRÈCE



SOMMAIRE

ANNALES

DE L'

INSTITUT PHYTOPATHOLOGIQUE BENAKI

NOUVELLE SÉRIE

VOLUME 1 — 1958 — N° 3

SUR L'UTILISATION DES ACIDES AMINÉS, COMME SOURCE UNIQUE D'AZOTE, PAR LES TISSUS VÉGÉTAUX NORMAUX CULTIVÉS *IN VITRO*

par

STÉPHANE D. DÉMÉTRIADÈS

Les plantes autotrophes, ainsi qu'un certain nombre d'hétérotrophes ont la possibilité de synthétiser leurs substances azotées organiques à partir de l'azote inorganique puisé dans leur milieu nutritif.

Il n'en est pas moins vrai que, dans certaines conditions, les plantes peuvent directement utiliser, pour leur métabolisme, des substances azotées organiques.

Lipman (1912) avait, il y a longtemps, observé que les céréales, cultivées avec des légumineuses, présentaient un développement supérieur grâce à l'absorption des acides aminés sécrétés dans le sol par les nodosités des racines de ces dernières.

En cultivant du blé, sur un milieu liquide, Schreiner et Skinner (1917) avaient constaté que la croissance était favorisée par l'asparagine, l'arginine, l'histidine, la guanine, la créatine, la créatinine et les acides nucléïques. Les dites substances additionnées dans un milieu contenant des nitrates provoquaient une augmentation de la croissance de 11 à 23 °/₀ par rapport aux nitrates seuls. Bien que ces cultures ne fussent pas aseptiques, on prenait des mesures pour éviter la contamination du milieu, qui était renouvelé tous les trois jours.

Des cultures aseptiques ont, d'ailleurs, conduit à des résultats analogues (Hutchinson et Miller 1912, Klein 1930, Virtanen et collab.

1933). L'asparagine était le mieux utilisée par l'orge. L'acide aspartique, par contre, favorisait les légumineuses mais point l'orge.

Selon Klein (1930) la glycine et l'alanine peuvent être utilisées, mais d'une manière moins efficace que l'asparagine et les acides aspartique et glutamique.

L'utilisation des substances azotées organiques a été, par ailleurs, démontrée avec des parties détachées de la plante. En immergeant des tiges de Tabac dans un milieu nutritif contenant de la proline, Klein et Linser (1933) constatèrent que ces plantes formaient plus de nicotine que celles qui ne recevaient pas cet acide aminé.

L'injection de cette substance dans les tiges, ainsi que de l'acide glutamique et de l'héxaméthylènetetramine, provoquait une augmentation des bétaïnes (Klein et Linser, 1932).

Pirschle (1929) a trouvé que les racines développées dans une solution nutritive contenant de l'urée présentaient une activité de l'uréase supérieure à celle des témoins. Ceci résulterait de l'absorption de l'urée. D'autre part, l'utilisation de cette substance par les plantules de maïs a été notée par Yamaguchi (1930).

Une revue de cette question est donnée par Nightingale (1937, 1948).

Spoerl (1948), étudiant l'assimilation d'un certain nombre de substances azotées organiques par les embryons d'orchidées, a trouvé que pour les jeunes embryons, provenant de graines non mûres, seule l'arginine avait un effet favorable, comparativement à celui des nitrates. Tous les autres acides aminés utilisés présentaient une action inhibitrice. Par contre, chez les embryons mûrs, seuls l'acide aspartique permettait un bon accroissement; l'acide glutamique ne favorisait pas le développement sans pourtant l'inhiber. Tous les autres exerçaient une nette inhibition.

La question de l'utilisation des acides aminés comme source d'azote fut aussi étudiée sur d'autres plantes comme par ex. sur les algues (Arnow et collaborateurs 1953), les champignons (Beckman et collaborateurs 1953, Déméetriadès 1953, Mix 1953, Pelletier et Keit 1953, 1954, Wolf 1953, Yukawa et Huzii 1952) et les bactéries (Gundersen 1955). De même sur les prothales de *Gymnogramme calomelanos* (Filicinée, Polypodiacée) cultivés *in vitro* (Sossountzov 1950a, 1950b, 1953, 1954a, 1954b et 1956).

La technique de la culture des tissus ou organes végétaux *in vitro* a ouvert des horizons nouveaux à la physiologie végétale, parce

qu'elle a permis d'étudier les tissus en dehors des actions régulatrices de l'ensemble de l'organisme. Grâce à cette technique on a pu approfondir la physiologie de la cellule végétale (Gautheret 1935, 1945, White 1943, 1954).

Les acquisitions récentes de la culture des tissus *in vitro*, surtout du point de vue physiologique, ont été exposées par White (1936, 1946, 1951) et Gautheret (1955).

Aux États-Unis on a, plus spécialement, étudié la physiologie des tissus tumoraux provenant soit de l'action de l'*Agrobacterium tumefaciens* (White et Braun, 1942) ou du virus *Aureogenus magnivena* sur les racines de *Rumex acetosa* L. (Black, 1947), soit de l'action de facteurs génétiques, comme dans le cas de l'hybride *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii* (White 1939).

Travaillant sur les tissus anormaux de la première et de la troisième catégorie, l'École de Riker a étudié l'effet, sur la croissance, de la température et de la concentration en ions d'hydrogène (Hildebrandt, Riker et Duggar, 1945), la nutrition minérale (Hildebrandt, Riker et Duggar 1946a), l'utilisation de divers sucres, polysaccharides et acides organiques (Hildebrandt et Riker 1946, 1949, 1950, Riker et Hildebrandt 1954a, 1954b, Hildebrandt, Riker et Watertor 1954), l'influence de certaines substances de croissance (Hildebrandt et Riker 1947) d'extraits de tissus et de levure (Hildebrandt, Riker et Duggar 1946b) et, enfin, l'utilisation de diverses sources d'azote (Riker et Gutsche 1948, Riker et Hildebrandt 1954a, 1954b).

Burkholder, Nickell et Brakke (Burkholder et Nickell 1949, Nickell et Burkholder 1950, Nickell 1950, 1954, 1955, Brakke et Nickell 1955) ont, d'autre part, étudié la physiologie des tissus isolés de tumeurs provoquées sur les racines de *Rumex acetosa* par le virus précité.

En Europe, par contre, Gautheret et ses élèves ont étudié les tissus normaux et plus particulièrement l'influence des substances de croissance, du pH, les besoins en vitamines etc. Heller (1953) a étudié la nutrition minérale de plusieurs tissus normaux.

Notre travail avait pour but d'étudier la possibilité de l'utilisation, par les tissus normaux cultivés *in vitro*, des acides aminés comme source unique d'azote.

Les recherches de Riker et autres sur l'assimilation de diverses sources d'azote concernaient les tissus tumoraux qui sont des tissus d'un type particulier.

Les résultats des chercheurs américains se limitent donc, à des cas pathologiques.

Nos recherches visaient, par contre, à étudier la question sur des tissus normaux*.

Riker et Gutsche (1948) ont examiné, comme nous l'avons dit plus haut, la question de l'utilisation de diverses sources d'azote par les tissus tumoraux d'*Helianthus annuus*. Selon leurs données, seule l'urée peut remplacer les nitrates. La dl-alanine permettait aussi un bon accroissement bien qu'inférieur à celui du témoin ($NaNO_3$). Le rendement était moins bon avec l'acide dl- et l-aspartique, l' l-asparagine, la glycine et l' l-arginine (HCl). Les autres acides aminés utilisés par ces chercheurs, c.a.d. l-cysteine (HCl), l-cystine, l-histidine (HCl), l-leucine, dl-leucine, dl-isoleucine, l-lysine (HCl), dl-threonine, dl-tryptophane et l-tyrosine étaient complètement inefficaces comme sources d'azote.

Il est à noter que les sels ammoniacaux, à l'exception du nitrate d'ammonium, étaient très mauvaises sources d'azote pour les tissus en question. Il en était de même pour les nitrites. Parmi les substances complexes l'hydrolysat de caséïne donnait des bons résultats, tandis que la peptone et l'extrait de levure n'en donnaient que de médiocres.

Nickell et Burkholder (1950) ont trouvé que pour les tissus des tumeurs des racines de *Rumex acetosa* et en l'absence complète d'azote, l'acide aspartique, l'arginine, la glycine, la proline et la threonine pourraient, bien que d'une manière restreinte, être utilisées comme sources d'azote. D'autre part, l'accroissement avec l'asparagine et l'histidine, ne dépassait pas celui manifesté dans le milieu dépourvu totalement d'azote. Enfin les α-alanine, acide α-aminobutyrique, citrulline, cysteine, cystine, acide glutamique, hydroxyproline, leucine, isoleucine, lysine, méthionine, ornithine, phénylalanine, serine, tryptophane, tyrosine et valine présentaient une action inhibitrice.

Dans le cas où le milieu contenait 4 mM de nitrate c'était encore l'arginine, l'acide aspartique, la glycine, la proline et la threonine qui donnaient les meilleurs résultats, bien que l'accroissement fût inférieur à celui obtenu avec le nitrate seul. Les autres substances exerçaient encore une action inhibitrice.

---

* Jusqu'à la fin de nos expériences nous ne connaissions aucun travail analogue concernant les tissus normaux. Ce n'est que vers la fin de 1957 que nous avons pris connaissance de l'article de Nitsch et Nitsch intitulé «Auxin dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. II. Organic nitrogenous compounds» et publié dans l'American Journal of Botany.

A notre connaissance, c'est le seul travail, concernant les tissus normaux qui ait été effectué parallèlement à nos propres recherches.

Selon les mêmes chercheurs, l'urée est une excellente source d'azote pour les tissus de *Rumex*. Par contre, les sels ammoniacaux étaient inférieurs aux nitrates.

Frank, Riker et Dye (1951) ont repris la question sur les tissus d'*Helianthus annuus* et l'hybride de *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*. Ils ont constaté que la dl-alanine pouvait être utilisée par les deux tissus avec des résultats satisfaisants.

L'acide glutamique était une bonne source d'azote pour les tissus d'*Helianthus*, mais pas pour les tissus de Tabac. La leucine ne pouvait pas être utilisée; à la concentration de 1 mM elle devenait même toxique.

Selon Nitsch (1957) l'α-alanine, l'acide γ-aminobutyrique, les acides aspartique et glutamique, la glutamine et l'urée donnés à des concentrations correspondant à 20 mM de nitrate, permettent une croissance des tissus d'*Helianthus tuberosus* égale à celle observée avec le nitrate. La glycine, l'asparagine, l'arginine et l'allantoïne donneraient des résultats inférieurs. Les acides α-aminobutyrique et α aminoisobutyrique ne pourraient se substituer à l'acide γ-aminobutyrique. De même la β alanine ne pourrait se substituer à l'α-alanine, ni la phénylglycine et la phénylalanine respectivement à la glycine et à l'alanine. L'arginine ne se remplacerait non plus par la citrulline et l'ornithine.

D'autre part, toujours selon Nitsch, la forme d- de α-alanine et des acides aspartique et glutamique aurait une action inhibitrice et la forme dl- serait inférieure à la forme l- qui donnerait les meilleurs résultats.

Ci-après nous exposons les résultats de nos recherches sur les tissus normaux.

MÉTHODES ET MATÉRIEL

Pour les tissus d'*Helianthus tuberosus*[1] et de *Lupinus albus*[2] nous avons utilisé la solution de Knop diluée de moitié (Gautheret 1942). Les tissus de *Salix capraea*[3] ont été cultivés soit sur la solution de Knop soit sur celle de Heller (1953).

A ces solutions minérales on ajoutait: a) 1 cc par litre de la so-

[1] Prélèvement primaire à partir des tubercules.

[2] Souche isolée par Morel (1950).

[3] Souche isolée par Gautheret (1948).

lution oligodynamique de Heller (1953), b) de la thiamine (10^{-6}) pour tous les tissus, et, en plus, de l'acide pantothenique (10^{-6}) et de la biotine (10^{-8}) pour les tissus de *Salix capraea* (Gautheret, 1948), c) de l'acide α-naphtalene acétique à la concentration de 10^{-7} sauf pour les tissus de *Lupinus albus* qui n'en recevaient pas, d) du glucose à la dose de 30 gr. par litre pour les tissus d'*Helianthus tuberosus* et *Lupinus albus* et de 20 gr. par litre pour les tissus de *Salix capraea* et e) de la gélose 7 gr. par litre.

Comme il s'agissait d'étudier des diverses sources d'azote, nous avons préparé des solutions de Knop et de Heller sans azote, en substituant les chlorures de chaux, de potassium et de sodium aux nitrates de ces mêmes éléments.

Comme source d'azote organique nous avons utilisé les acides aminés suivants: glycine, dl-α-alanine, β-alanine, dl-valine, l-leucine, dl-isoleucine, dl-serine, dl-thréonine, dl-β-phénylalanine, l-tyrosine, dl-tryptophane, l-proline, l-hydroxyproline, l-cysteine (HCl), l-cystine, dl-méthionine, acide l-aspartique, l-asparagine, acide l-glutamique, l-glutamine, dl-lysine (HCl), l-arginine (HCl), l-histidine (HCl), dl-citrulline et dl-ornithine (HBr.).

La peptone fut aussi utilisée.

La solution de Knop (Gautheret 1942) contient 0.076 gr. d'azote par litre. Celle de Heller (1953) 0.099 gr. Les concentrations utilisées dans nos expériences étaient de 0.04, 0.2, 1, 5.4, 27 et 135 mM pour les substances contenant un atome d'azote par molécule. (Pour les substances ayant deux atomes d'azote les concentrations étaient 0.02, 0.1, 0.5, 2.7, 13.5 et 67 mM et pour celles contenant trois atomes d'azote 0.013, 0.066, 0.33, 1.80, 9 et 45 mM).

Ainsi la quantité d'azote par litre était dans tous les cas 0.6, 3, 15, 76, 380 et 1900 mgr. par litre. Lorsqu'il s'agissait d'acides aminés dl- la dose était doublée, étant donné que les tissus végétaux n'utilisent que la forme l-.

Les solutions nutritives étaient stérilisées à 115° C pendant 20 minutes. La durée de la culture était de 45 jours pour les tissus d'*Helianthus tuberosus* et *Lupinus albus* et de 60 jours pour les tissus de *Salix capraea*. La température de la pièce où se trouvaient les cultures oscillait de 18 à 22° C pendant l'hiver et de 25 à 28° C pendant l'été.

Avant la stérilisation et l'addition de la gélose, le pH des solutions nutritives était ajusté à 5.

Le nombre des cultures, pour chaque cas, était de 6 à 8.

Nous avons pris pour criterium de croissance non pas l'augmentation relative du poids de la culture $\frac{P-p}{p}$ (où P=poids final et p= poids initial de l'explantat) mais la valeur absolue P—p, étant donné que cette dernière et plus exacte (Heller 1953). Les résultats ont été soumis à l'analyse statistique (contrôle du t).

RÉSULTATS

A. TISSUS DE *SALIX CAPRAEA*

Les résultats obtenus avec ces tissus sont rassemblés dans le tableau I. Pour que la comparaison, entre les divers cas examinés, soit possible, nous avons exprimé l'augmentation du poids des cultures en pourcentage de l'augmentation obtenue chez le témoin ($NaNO_3$ 5.4 mM). Le poids initial des explantats était de 100 mgr. environ.

Sur le milieu dépourvu d'azote la croissance des explantats correspond à 21 °/₀ de celle du témoin représenté par le nitrate de sodium à 5.4 mM. Toute augmentation supérieure à 21 °/₀ indique une utilisation de la substance essayée. Par contre, tout accroissement inférieur à 21 °/₀ montre l'existence d'une action inhibitrice.

Le nitrate de sodium à la concentration de 0.2 mM n'améliore point l'accroissement obtenu sur le milieu dépourvu d'azote. A la concentration de 1 mM la croissance des tissus atteint 50 °/₀ du maximum.

Aux doses de 5.4 et 27 mM on obtient le maximum de l'accroissement. Au-delà de ces concentrations le nitrate devient toxique (Fig. 1I).

Parmi les dix neuf acides aminés utilisés dans ces séries d'expériences, trois seulement peuvent être utilisés comme sources d'azote par les tissus de *Salix capraea* d'une manière aussi satisfaisante que le nitrate. Ce sont en premier lieu l'acide l-aspartique et la l-arginine et, en second lieu, la l-glutamine (Fig. 1 II, III, 2II, 3, 4 et 5).

Dans le cas des deux premiers la courbe de croissance coïncide, entre 0.2 et 5.4 mM avec celle du nitrate. A la concentration de 27 mM l'acide aspartique devient toxique, tandis que l'arginine montre encore une action favorable bien qu'inférieure aux précédentes.

La croissance des tissus avec la glutamine à la dose de 5.4 mM n'atteint que 80 °/₀ du développement maximum.

La dl-ornithine, à la concentration de 1 mM peut servir, bien que d'une façon restreinte, comme source d'azote. A des doses plus fortes elle devient pourtant manifestement toxique (Fig. 2I).

TABLEAU I

Utilisation de divers acides aminés, comme source unique d'azote, par les tissus de *Salix capraea*, cultivés *in vitro*

Substances utilisées	Quantité d'azote (mgr./litre)					
	0	3 mM 0 2*	15 mM 1*	76 mM 5.4*	380 mM 27*	1900 mM 135*
—	21**					
Nitrate de sodium		21	49	100	100	3
Chlorure d'ammonium			21	21	3	
Glycine			21	0	0	0
dl-α-alanine		3	0	0	0	
β-alanine		3	0	0	0	
dl-valine		21	0	0	0	
l-leucine		21	3			
dl-serine		21	3	3		
dl-β-phénylalanine		21	21	3		
l-tyrosine		3	3	0		
dl-tryptophane		21	3	3	0	
l-proline		21	3	3	3	
l-cysteine (HCl)		21	21	0		
acide l-aspartique		21	49	100	3	
l-asparagine			49	3	3	0
acide l-glutamique		21	21	21	0	
l-glutamine		49	49	80		
l-arginine (HCl)		21	49	100	49	
l-histidine (HCl)		21	21	3		
dl-citrulline		21	21	3	3	
dl-ornithine (HBr)		21	49	3	3	
Peptone		21	21	49	21	3

* Les mM correspondent aux substances contenant un atome d'azote. Pour celles ayant deux ou trois atomes d'azote la dose fut calculée de sorte que l'azote fourni corresponde aux mM notés.

** L'accroissement du poids des tissus est exprimé en pourcentage de celui donné par 5.4 mM de nitrate de sodium.

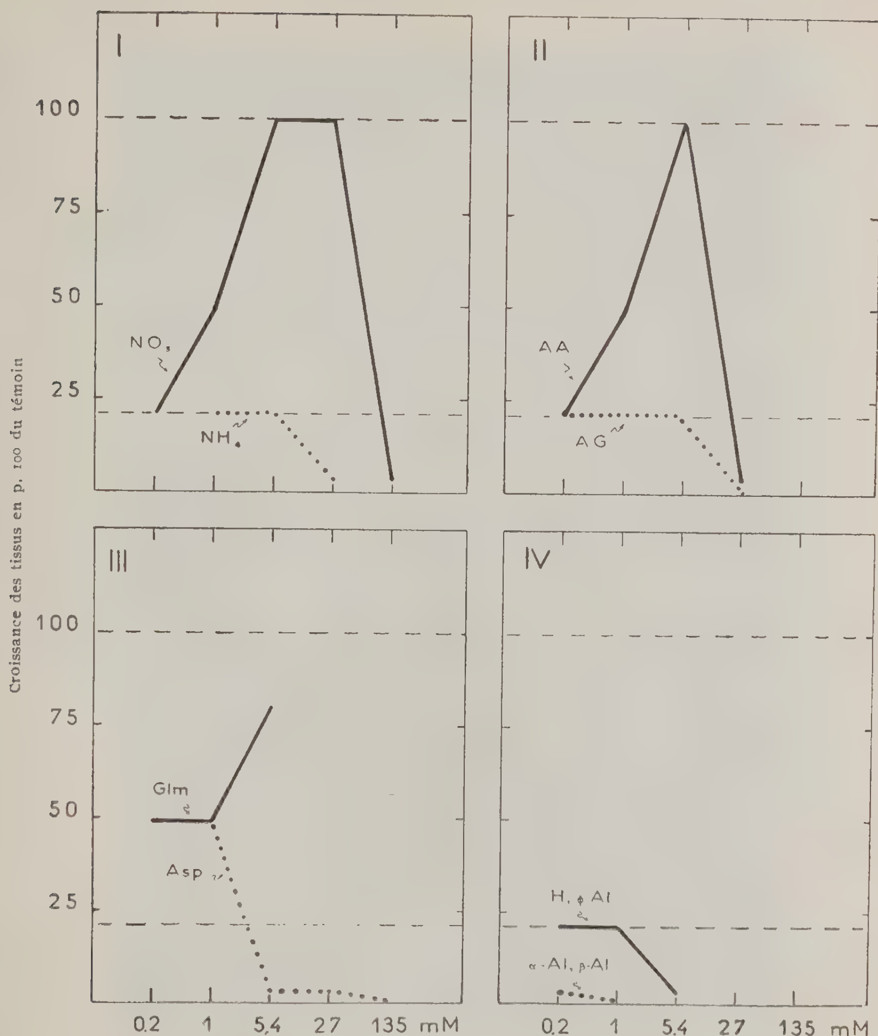


Fig. 1. Courbes de croissance des tissus de *Salix capraea* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. NO_3: nitrate de sodium, NH_4: chlorure d'ammonium. II. AA: acide l-aspartique, AG: acide l-glutamique. III. Glm: l-glutamine, Asp: l-asparagine. IV. H: l-histidine (HCl), φ-Al: dl-β-phénylalanine, α-Al: dl-α-alanine, β-Al: β-alanine. La ligue horizontale en tirets d'en haut correspond à la croissance due au nitrate de sodium à la dose de 5.4 mM (témoin), celle d'en bas à la croissance observée sur le milieu dépourvu d'azote. Les mM ont été calculés pour les substances contenant un atome d'azote. Pour les substances ayant deux ou trois atomes d'azote la dose était telle qu'elle corresponde aux mM notés.

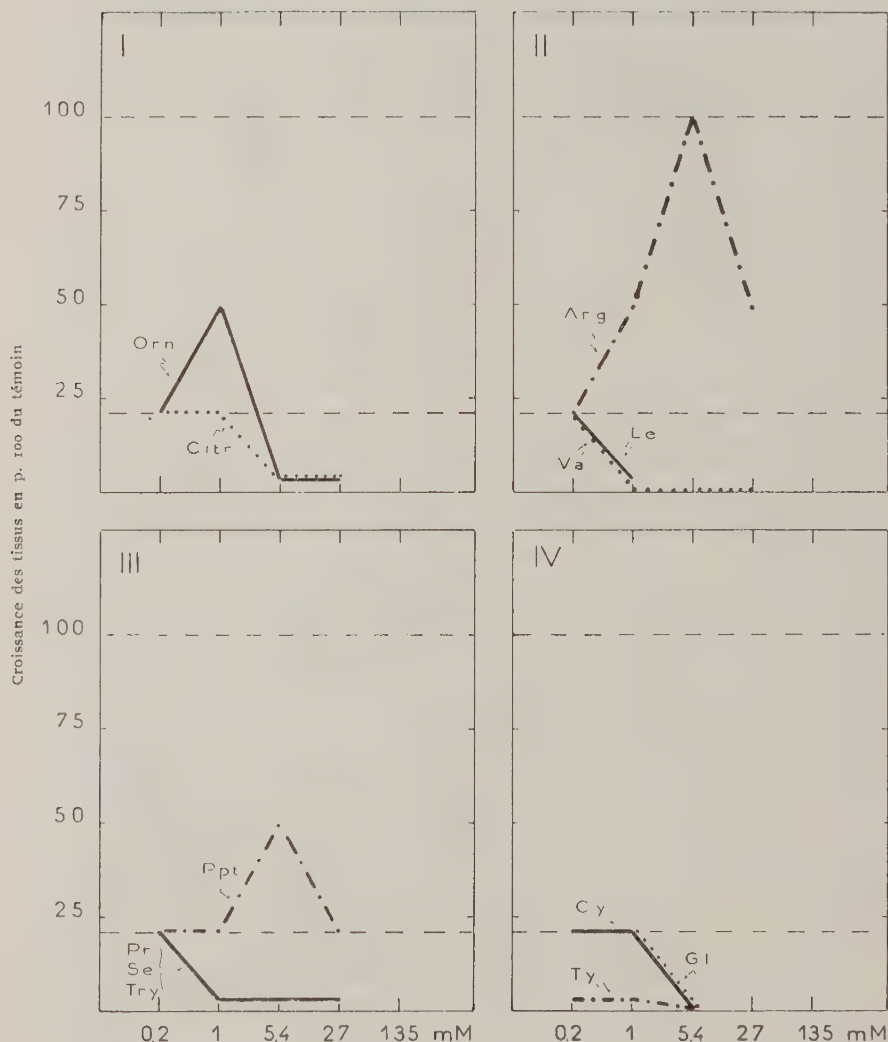


Fig. 2.—Courbes de croissance des tissus de *Salix capraea* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. Orn: dl-ornithine (HBr), Citr: dl-citrulline. II. Le: l-leucine, Arg: l-arginine (HCl), Va: dl-valine. III. Pr: l-proline, Se: dl-serine, Try: dl-trytophane, Ppt: peptone. IV. Cy: l-cysteine (HCl), Ty: l-tyrosine, Gl: Glycine. La ligne horizontale en tirets d'en haut correspond à la croissance au nitrate de sodium à la dose de 5.4 mM (témoin), celle d'en bas à la croissance observée sur le milieu dépourvu d'azote. Pour les mM voir explication de la Fig. 1.

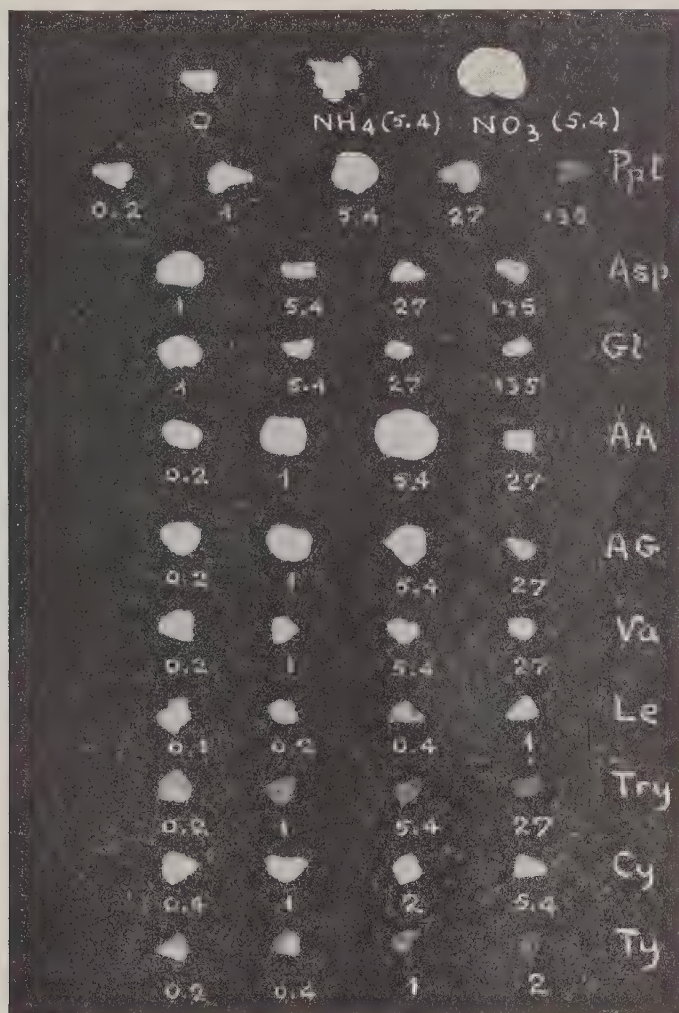


Fig. 3.— Cultures des tissus de *Salix capraea* au bout de 60 jours, obtenues avec diverses sources d'azote O : sans azote. NH_4 : chlorure d'ammonium. NO_3 : nitrate de sodium. Ppt : peptone. Asp : l-asparagine. Gl : glycine. AA : acide l-aspartique. AG : acide l-glutamique. Va : dl-valine. Le : l-leucine. Try : dl-tryptophane. Cy : l-cysteine (HCl). Ty : l-tyrosine. Les substances en question ont été ajoutées à des doses telles qu'elles fournissent la quantité d'azote qui serait contenue dans du nitrate de sodium aux mM notés.

Les autres acides aminés utilisés c.a.d. glycine, dl-α-alanine, β-alanine, dl-valine, l-leucine, dl-serine, dl-β-phénylalanine, l-tyrosine, dl-tryptophane, l-proline, l-cysteine (HCl), l-asparagine, acide l-glutamique, l-histidine (HCl) et dl-citrulline ne peuvent pas remplacer le nitrate de sodium. Au contraire ils exercent une action toxique très

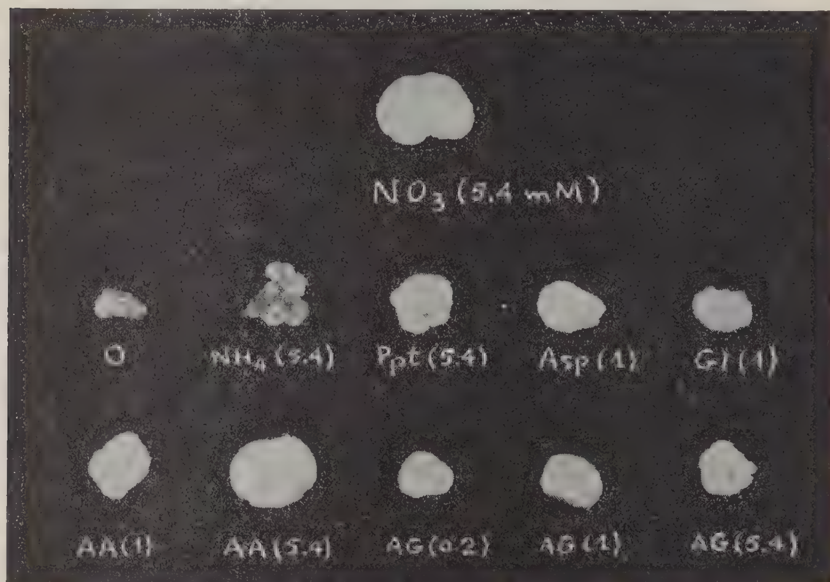


Fig. 4.— Croissance des tissus de *Salix capraea* sur diverses sources d'azote. NO_3: nitrate de sodium. O: sans azote. NH_4: chlorure d'ammonium. Ppt: peptone. Asp: l-asparagine. Gl: glycine. AA: acide l-aspartique. AG: acide l-glutamique. (Les chiffres entre parenthèse correspondent à des mM de nitrate de sodium).

nette aux doses supérieures à 3 mgr. d'azote par litre (Fig. 1 II, III, IV, 2 I, II, III, IV). Parmi ces acides les plus toxiques sont, en premier lieu, les dl-α-alanine, β-alanine et l-tyrosine; en second lieu les dl-valine, l-leucine, l-proline, dl-serine et dl-tryptophane (Fig. 1 IV et 2 II, III, IV).

La peptone, ajoutée à une dose correspondant à 76 mgr. d'azote par litre, permet un accroissement de la culture égal à 50 °/₀ du maximum (Fig. 2 III).

L'utilisation de l'ion ammoniacal.

En examinant les résultats indiqués dans le tableau I, on constate que l'ion ammoniacal ne permet pas le développement des tissus

de *Salix capraea* à des concentrations de 1 à 5.4 mM et qu'il est nettement toxique à la dose de 27 mM (Fig. 11).

Étant donné que sous les conditions normales les plantes réduisent en ammoniac les nitrates absorbés et synthétisent, à partir de cet ammoniac et des acides cétoniques, leurs acides aminés, l'on pourrait, à priori, admettre que l'ion ammoniacal serait une source d'azote idéale pour les tissus végétaux. L'expérience nous montre, néanmoins, le contraire (Heller 1953, Riker et colab. 1948, résultats du présent travail). Il est à noter que l'NH_4 est mal utilisé aussi par les champignons (Démétriadès 1953). La diminution du pH pourrait expliquer l'action défavorable du NH_4 dans le cas des milieux liquides (Appa Rao 1956). Heller (1953) a pourtant pu vérifier que les variations du pH, causées par l'addition du chlorure d'ammonium, n'étaient pas suffisantes pour expliquer le mauvais rendement de cette substance. La gélose tamponne d'ailleurs fortement le milieu. Heller a remarqué que la coloration du milieu contenant du chlorure d'ammonium était, à la sortie de l'autoclave, légèrement jaunâtre, ce qui pourrait être l'indice d'une altération du glucose. Il se pourrait donc que la toxicité de l'ion ammoniacal fût éventuellement due à l'altération du glucose au cours de la stérilisation. Cet auteur n'a pas vérifié expérimentalement cette hypothèse.

Pour élucider cette question nous avons cultivé les tissus de *Salix capraea* sur un milieu recevant le chlorure d'ammonium d'une part avant la stérilisation et, d'autre part, dans une série parallèle, après la stérilisation par l'introduction aseptique de la solution convenable du NH_4Cl.

Les résultats de ces expériences se trouvent dans le tableau II.

TABLEAU II

Croissance des cultures des tissus de *Salix capraea* sur un milieu nutritif contenant, comme source unique d'azote, du chlorure d'ammonium

Chlorure d'NH_4 ajouté :	Poids de la culture en pourcentage de celui du témoin ($NaNO_3$ 5.4 mM)		
	Concentration en NH_4Cl		
	1 mM	5.4 mM	27 mM
Avant la stérilisation	21	21	3
Aseptiquement, après stérilisation	21	21	3

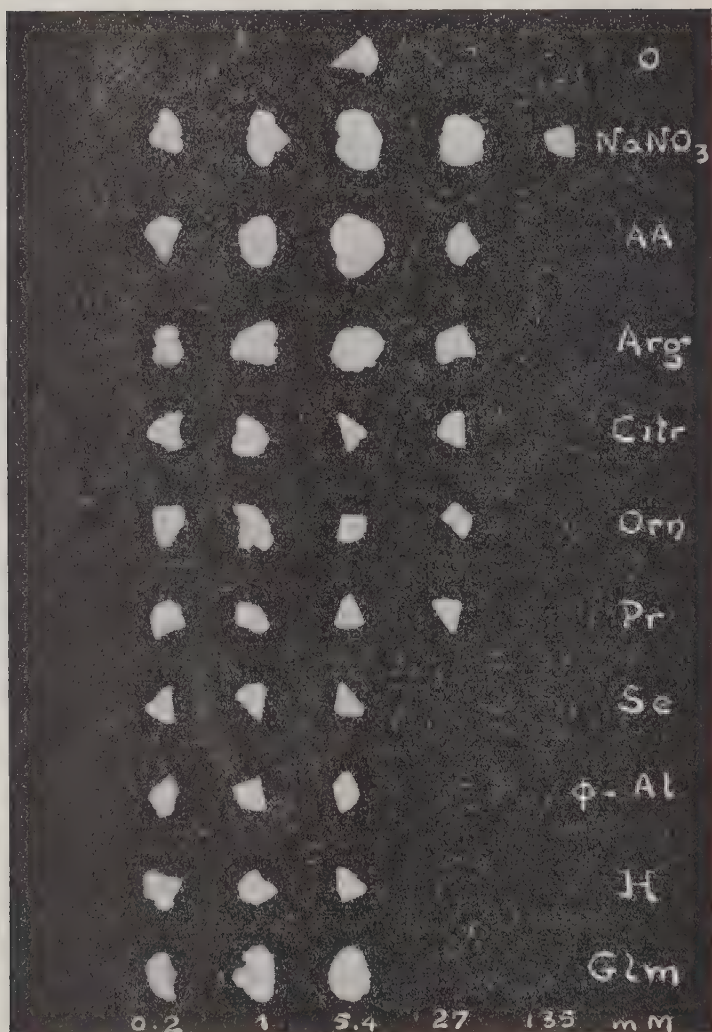


Fig. 5.— Cultures des tissus de *Salix capraea* au bout de 60 jours, obtenues avec diverses sources d'azote. O : sans azote. AA : acide l-aspartique. Arg : l-arginine (HCl). Citr : dl-citrulline. Orn : dl-ornithine (HBr). Pr : l-proline. Se : dl-serine. φ-Al : dl-β-phénylalanine. H : l-histidine (HCl). Glm : l-glutamine. Pour les doses voir explications de la fig 3.

En examinant les données ci-dessus on constate que dans les deux cas l'ion ammoniacal ne permet qu'un mauvais développement des cultures. Par conséquent, la toxicité de l'ion NH_4 ne pourrait pas être attribuée à l'altération du glucose pendant la stérilisation.

Addition de l'acide aspartique dans un milieu contenant des nitrates :

Dans un milieu contenant 5.4 mM de nitrate de sodium, nous avons ajouté des doses croissantes d'acide aspartique, allant de 0.1 à 1 mM. Dans le tableau III se trouvent rassemblés les résultats de ces expériences.

TABLEAU III

Développement des cultures de *Salix capraea* sur un milieu contenant, en plus du nitrate de sodium à 5.4 mM, de l'acide aspartique

Croissance exprimée en pourcentage du témoin ($NaNO_3$ 5.4 mM)				
Concentration en acide aspartique (mM)				
0	0,1	0,2	0,5	1
100	100	100	100	14

On constate que l'addition de l'acide aspartique de 0.1 à 0.5 mM dans un milieu contenant déjà 5.4 mM de nitrate de sodium, n'a aucune influence sur la croissance des tissus de *Salix capraea*, mais qu'à la dose de 1 mM il se manifeste une forte inhibition. Ces résultats sont à rapprocher de ceux qui ont été obtenus par Riker et Gutsche (1948) sur les tissus tumoraux d'*Helianthus annuus*. Ces chercheurs ont en effet trouvé que l'acide aspartique, ajouté dans un milieu contenant la quantité optimum de nitrates, provoque une inhibition, de 1 à 4 mM, qui disparaît à des doses plus fortes (de 16 à 64 mM).

Un phénomène analogue fut observé, par les mêmes chercheurs, avec l'acide glutamique et l'alanine.

Frank et ses collaborateurs (1951) et Nickell et Burkholder (1950) n'ont pourtant pas constaté un tel phénomène sur les tissus de Tabac et des tumeurs des racines de *Rumex acetosa*.

B. TISSUS DE *LUPINUS ALBUS*

Le poids des explantats de ces cultures était environ de 70 mgr. Les résultats des expériences sur ces tissus se trouvent dans le tableau IV et les Fig. 6 et 7.

TABLEAU IV

Utilisation de divers acides aminés, comme unique source d'azote, par les tissus de *Lupinus albus* cultivés *in vitro*

Substances utilisées	Quantité d'azote (mgr./litre)					
	0	3 mM 0.2*	15 mM 1*	76 mM 5.4*	380 mM 27*	1900 mM 135*
—	11**					
Nitrate de sodium		33	100	100	100	11
Chlorure d'ammonium		33	11	11	11	
Glycine		11	33	33		
dl-α-alanine		33	33	33		
dl-serine		11	11	11		
l-proline		11	11	11	11	
l-cysteine (HCl)		11	11	11		
dl-méthionine		11	11	11		
acide l-aspartique		33	33	100	11	
l-asparagine		33	100	100	11	
acide l-glutamique		33	33	100	11	
l-glutamine		11	33	11		
dl-lysine (HCl)		11	11	11	11	
l-arginine (HCl)		33	33	11		
l histidine (HCl)		11	11	11		
dl-citrulline		11	11	11	11	
dl-ornithine (HBr)		11	11	11	11	
Peptone		33	33	100	11	

* Les mM correspondent aux substances contenant un atome d'azote. Pour celles ayant deux ou trois atomes d'azote la dose fut calculée de sorte que l'azote fourni corresponde aux mM notés.

** L'accroissement du poids des tissus est exprimé en pourcentage de celui donné par 5.4 mM de nitrate de sodium.

La croissance de ces tissus se développant sur un milieu privé d'azote n'atteint que 11 °/₀ de la croissance obtenue avec le nitrate à 5.4 mM.

Le nitrate de sodium à 0.2 mM (3 mgr. d'N par litre) permet

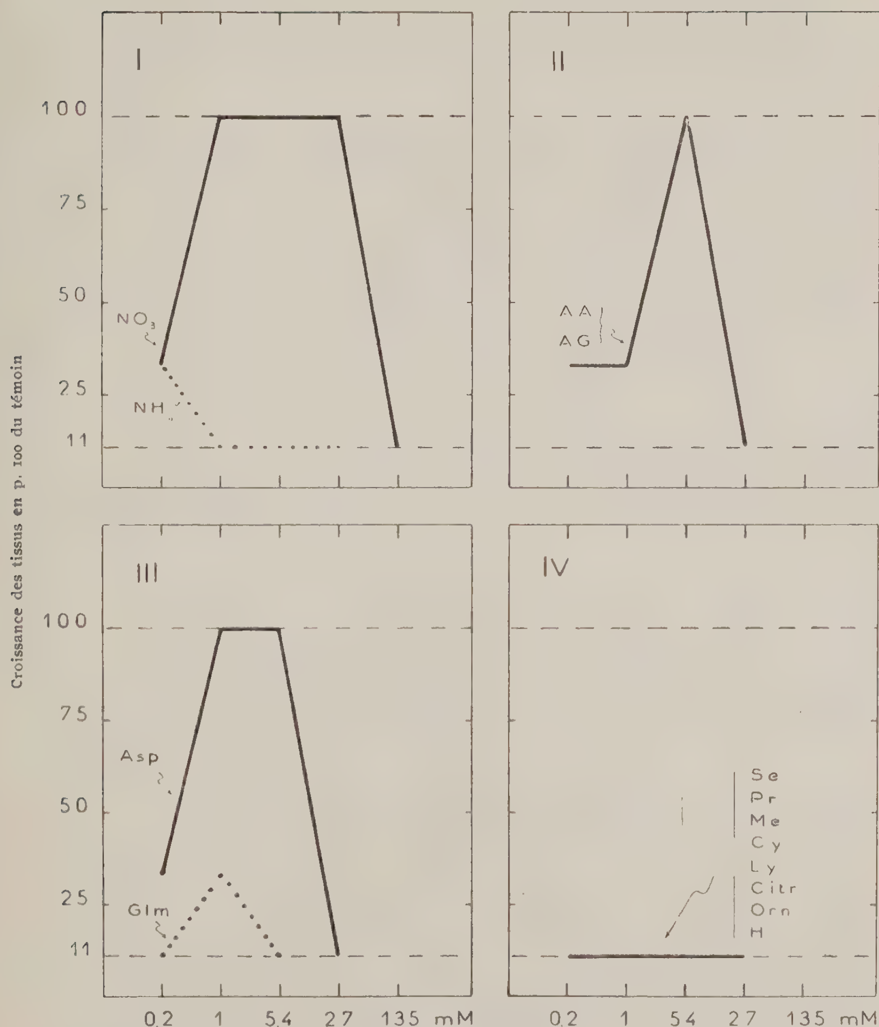


Fig. 6.— Courbes de croissance des tissus de *Lupinus albus* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. NO_3: nitrate de sodium, NH_4: chlorure d'ammonium. II. AA: acide l-aspartique, AG: acide l-glutamique. III. Asp: l-asparagine, Glm: l-glutamine. IV. Se: dl-serine, Pr: l-proline, Me: dl-methionine, Cy: l-cysteine (HCl), Ly: dl-lysine (HCl), Citr: dl-citrulline, Orn: dl-ornithine (HBr), H: l-histidine (HCl). La ligne horizontale en tirets d'en haut correspond à la croissance due au nitrate de sodium à la dose de 5.4 mM (témoin). Celle d'en bas à la croissance observée sur le milieu dépourvu d'azote. Pour les mM voir explication de la Fig. 1.

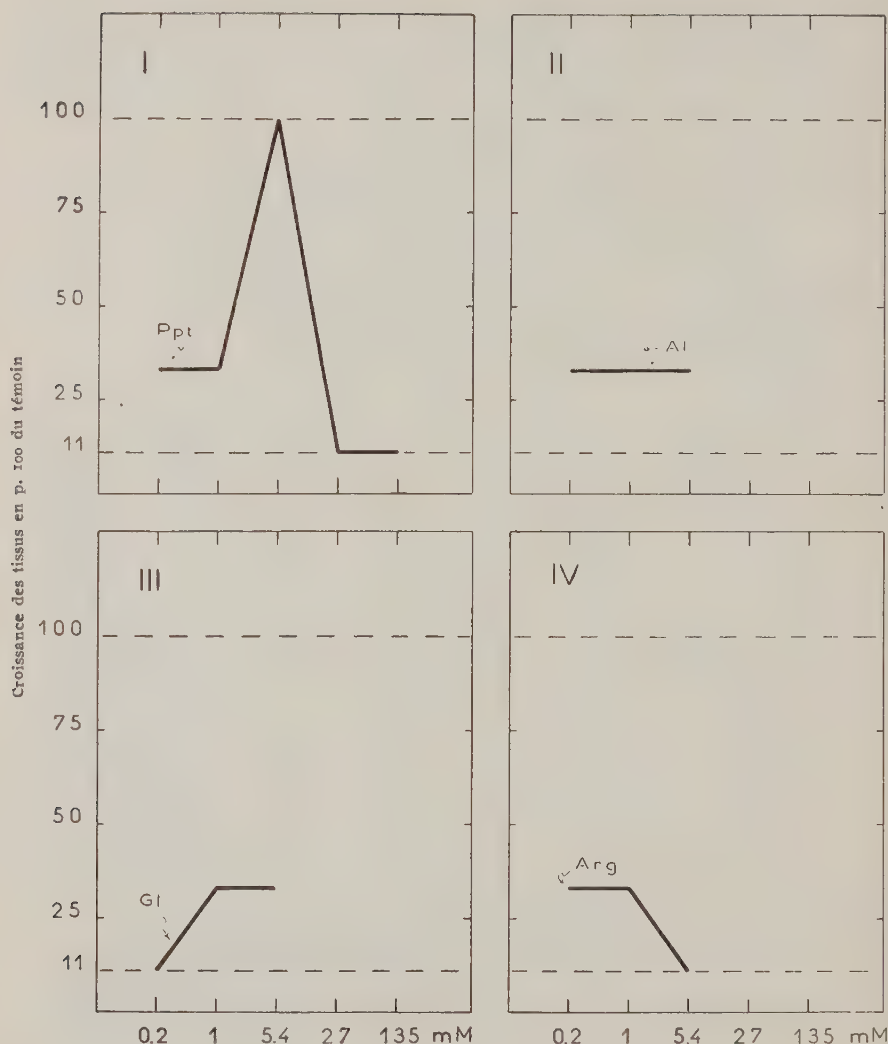


Fig. 7.— Courbes de croissance des tissus de *Lupinus albus* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. Ppt: peptone. II. α-Al: dl-α-alanine. III. Gl: glycine. IV. Arg: l-arginine (HCl). La ligne horizontale en tirets d'en haut correspont à la croissance due au nitrate de sodium à la dose de 5.4 mM (témoin). Celle d'en bas à la croissance observée sur le milieu dépourvu d'azote. Pour les mM voir explication de la Fig. 1.

déjà une croissance notable qui atteint son maximum aux doses de 1, 5.4 et 27 mM. A la dose de 135 mM on constate une chute de l'acroissement jusqu'au niveau qui correspond au milieu privé d'azote (Fig. 6I).

Dans le cas des tissus de *Lupinus albus*, l'acide aspartique, l'asparagine et l'acide glutamique sont utilisés aussi bien que le nitrate (Fig. 6II, III). Par contre la glycine, la dl-α-alanine, la l-glutamine et la l-arginine (HCl) ne permettent qu'un accroissement du poids des cultures médiocre (33 % par rapport au témoin). Tous les autres acides aminés utilisés c.a d. dl-serine, l-proline, l-cysteine, dl-methionine, dl-lysine, l-histidine, dl-citrulline et dl-ornithine sont inutilisables, comme sources d'azote, par les tissus en question (Fig. 6 et 7).

La peptone, comme dans le cas des tissus de *Salix capraea*, permet une belle croissance à une dose correspondant à 76 mgr. d'azote par litre (Fig. 7I).

Enfin le chlorure d'ammonium se révèle mauvaise source d'azote à toutes les concentrations sauf à celle de 0.2 mM à laquelle l'on constate une faible croissance (Fig. 6I).

C. TISSUS D'*HELIANTHUS TUBEROSUS*

Dans le cas de ces tissus le développement des explantats, qui pesaient 60 mgr. environ, sur un milieu dépourvu d'azote, atteint 39% de celui obtenu avec le nitrate à 5.4 mM (témoin). C'est que probablement les explantats, provenant directement de tubercules, contiennent beaucoup plus de réserves que les tissus cultivés *in vitro* depuis longtemps.

La croissance maximum s'obtient avec le nitrate à la dose de 27 mM. A la concentration de 0.04 mM ce sel n'exerce aucune action favorable, tandis qu'à la dose de 135 mM il présente une action inhibitrice nette (Fig. 8I).

Quant aux acides aminés, l'acide aspartique est, pour les mêmes tissus, une bonne source d'azote, bien que le rendement soit inférieur à celui des autres tissus examinés. A la concentration de 5.4 mM le poids des cultures n'atteint que la moitié de celui du témoin ($NaNO_3$ 5.4 mM) et à la dose de 27 mM la croissance correspond au 76 % de celle du témoin (Fig. 8II).

Par contre l'acide glutamique présente une action toxique tant à la dose de 1 mM qu'à celle de 5.4 mM (Fig. 8II). L'arginine et la citrulline ne peuvent être utilisées comme source d'azote qu'en partie. La première de ces substances permet, aux doses de 0.2, 1 et 5.4 mM, une

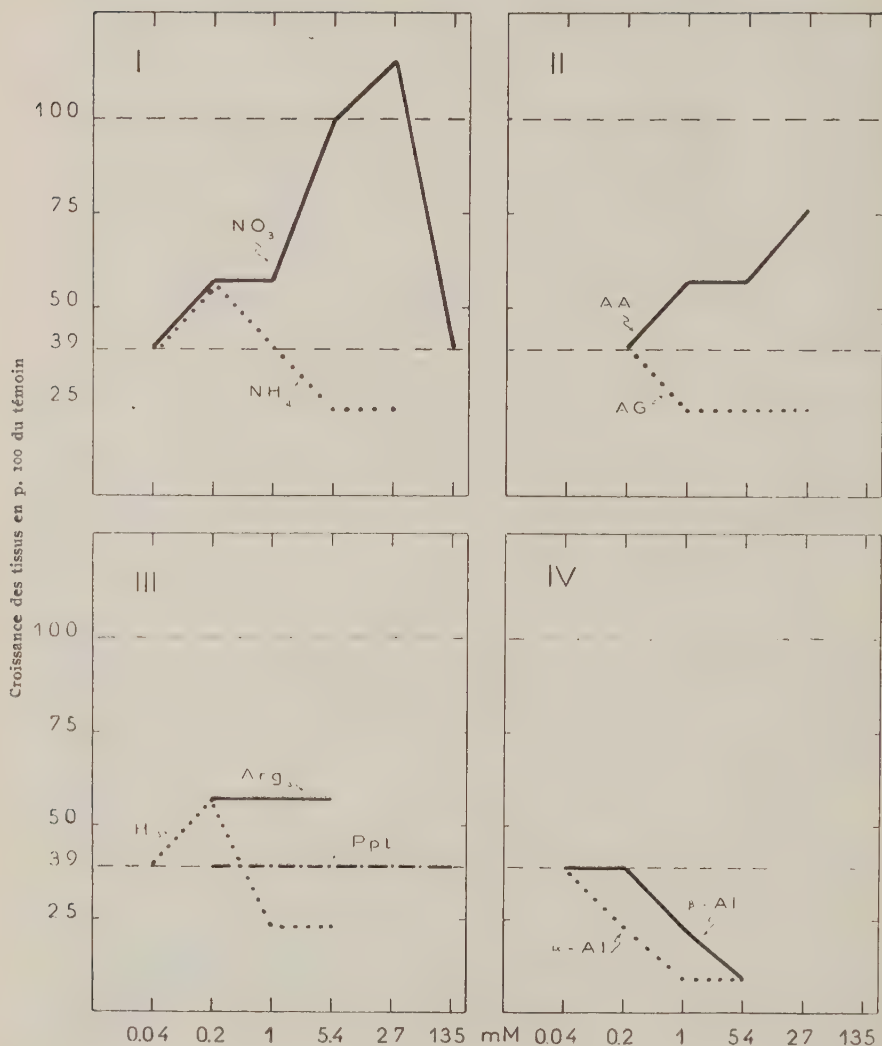


Fig. 8.— Courbes de croissance des tissus d'*Helianthus tuberosus* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. NO_3: nitrate de sodium, NH_4: chlorure d'ammonium. II. AA: acide l-aspartique, AG: acide l-glutamique. III. Arg: l-arginine (HCl), H: l-histidine (HCl), Ppt: peptone. IV. α-Al: dl-α-alanine, β-Al: β-alanine. La ligne horizontale en tirets d'en haut correspond à la croissance due au nitrate de sodium à la dose de 5.4 mM (témoin). Celle d'en bas à la croissance observée sur le milieu dépourvu d'azote. Pour les mM voir explication de la Fig. 1.

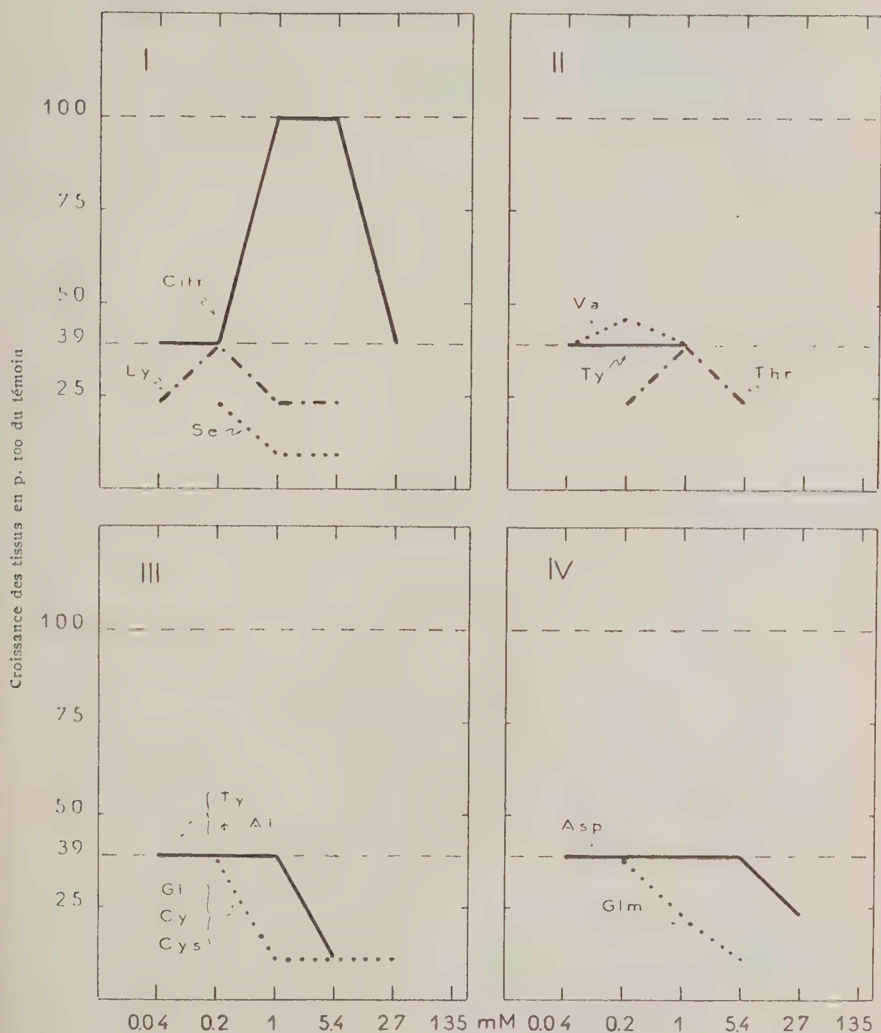


Fig. 9.— Courbes de croissance des tissus d'*Helianthus tuberosus* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. Citr: dl-citrulline, Ly: dl-lysine (HCl), Se: dl-serine. II. Ty: l-tyrosine, Va: dl-valine, Thr: dl-threonine. III. Try: dl-tryptophane, φ-Al: dl-β-phénylalanine, Gl: glycine, Cy: l-cysteine (HCl), Cys: l-cystine. IV. Asp: l-asparagine, Glm · l-glutamine. La ligne horizontale en tirets d'en haut correspond à la croissance due au nitrate de sodium à la dose de 5.4 mM (témoin). Celle d'en bas à la croissance observée sur le milieu dépourvu d'azote. Pour les mM voir explication de la Fig. 1.

augmentation du poids des cultures égale au 57 °/₀ de celle du témoin. La deuxième donne les mêmes résultats aux concentrations de 1 et 54 mM (Fig. 8III et 9I).

Les acides aminés suivants: glycine, α- et β-alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane,

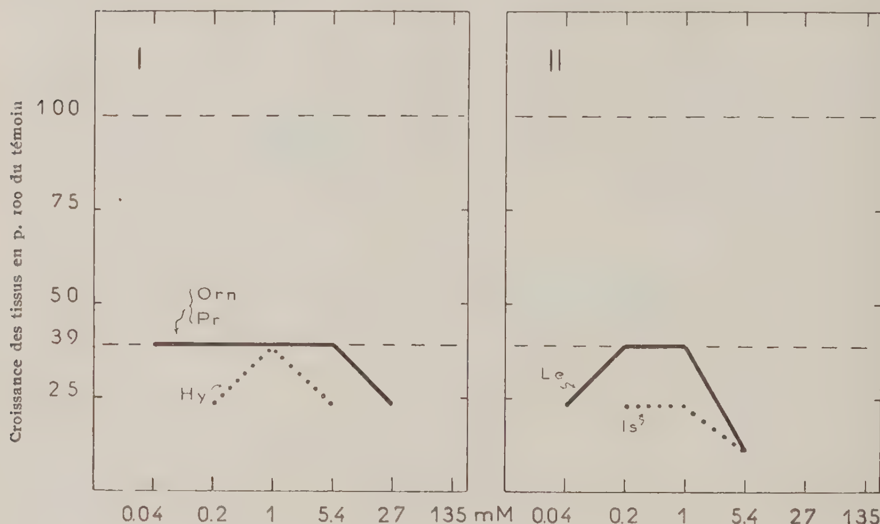


Fig. 10.— Courbes de croissance des tissus d'*Helianthus tuberosus* cultivés sur des milieux contenant diverses sources d'azote. I. Orn: dl-ornithine (HBr), Pr: l-proline, Hy: l-hydroxyproline. II. Le: l-leucine, Is: dl-isoleucine. Pour les autres détails voir explication de la Fig. 9.

proline, hydroxyproline, cysteine, cystine, méthionine, asparagine, glutamine, lysine, histidine et ornithine, donnent un accroissement égal ou inférieur à celui observé sur le milieu privé d'azote (Fig. 8, 9 et 10). Il en est de même avec la peptone. La glutamine est, dans ce cas, plus toxique que l'asparagine (Fig. 9IV).

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans les tableaux V et VI et les Fig. 11 et 12.

L'ion ammoniacal est encore dans ce cas une très mauvaise source d'azote et manifestement toxique aux doses de 5.4 et 27 mM (Fig. 8I et 13).

TABLEAU V

Utilisation de divers acides aminés, comme source unique d'azote, par les tissus d'*Helianthus tuberosus* cultivés *in vitro*

Substances utilisées	Quantité d'azote (mgr/litre)						
	0	0,6 mM 0 04*	3 mM 0.2*	15 mM 1*	76 mM 5.4*	380 mM 27*	1900 mM 135*
—	39**						
Nitrate de sodium		39	57	57	100	115	39
Chlorure d'ammonium		39	57	39	23	23	
Glycine			39	9	9	9	
dl-α-alanine		39	23	9	9		
β-alanine		39	39	23	9		
dl-valine		39	46	39			
l-leucine		23	39	39	9		
dl-isoleucine			23	23	9		
dl serine			23	9	9		
dl-threonine			23	39	23		
dl-β-phénylalanine		39	39	39	9		
l-tyrosine		39	39	39			
dl-tryptophane		39	39	39	9		
l-proline			39	39	23	23	
l-hydroxyproline			23	39	23		

* Les mM correspondent aux substances contenant un atome d'azote. Pour celles ayant deux ou trois atomes d'azote la dose fut calculée de sorte que l'azote fourni corresponde aux mM notés.

** L'accroissement du poids des tissus est exprimé en pourcentage de celui donné par 5.4 mM de nitrate de sodium.

TABLEAUX VI

Utilisation de divers acides aminés, comme source unique d'azote, par les tissus d'*Helianthus tuberosus* cultivés *in vitro*

Substances utilisées	Quantité d'azote (mgr /litre)						
	0	0,6 mM 0.04*	3 mM 0.2*	15 mM 1 *	76 mM 5.4 *	380 mM * 27	1900 mM 135*
—	39**						
l-cysteine (HCl)			39	9	9	9	
l-cystine			39	9	9	9	
dl-méthionine			23	23	9		
acide l-aspartique		39	39	57	57	76	
l-asparagine			39	39	39	23	
acide l-glutamique		39	39	23	23	23	
l-glutamine			39	23	9		
dl-lysine (HCl)			39	23	23		
l-arginine (HCl)		23	57	57	57		
l-histidine (HCl)			57	23	23		
dl-citrulline		39	39	57	57	39	
dl-ornithine (HBr)		39	39	39	23	23	
Peptone		39	39	39	39	39	39

* Les mM correspondent aux substances contenant un atome d'azote. Pour celles ayant deux ou trois atomes d'azote la dose fut calculée de sorte que l'azote fourni corresponde aux mM notés.

** L'accroissement du poids des tissus est exprimé en pourcentage de celui donné par 5.4 mM de nitrate de sodium.

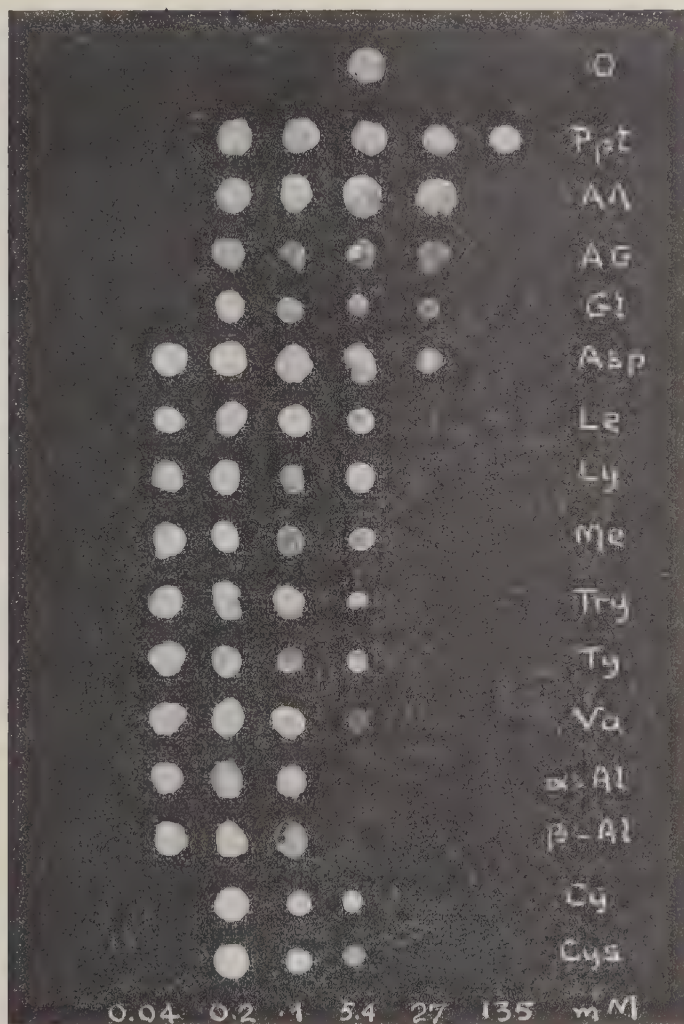


Fig. 11.— Croissance d'explantats des tissus d'*Helianthus tuberosus* au bout de 45 jours de culture sur un milieu contenant diverses sources d'azote. O: sans azote. Ppt: peptone AA: acide l-aspartique. AG: acide l-glutamique. Gl: glycine. Asp: l-asparagine. Le: l-leucine. Ly: dl-lysine (HCl). Me: dl-methionine. Try: dl-tryptophane. Ty: l-tyrosine. Va: dl-valine. α-Al: dl-α-alanine. β-Al: β-alanine. Cy: l-cysteine (HCl). Cys: l-cystine. Les substances en question ont été ajoutées à des doses telles qu'elles fournissent la quantité d'azote qui serait contenue dans du nitrate de sodium aux mM correspondants.

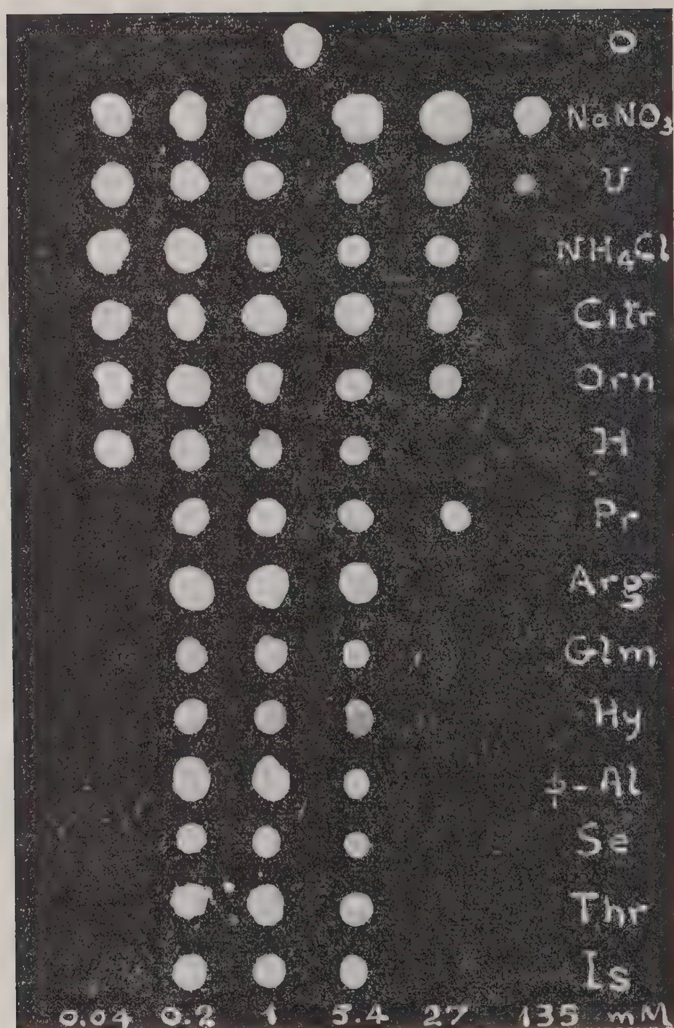


Fig. 12.—Croissance d'explantats des tissus d'*Helianthus tuberosus* au bout de 45 jours de culture sur un milieu contenant diverses sources d'azote. O : sans azote. Citr : dl-citrulline. Orn : dl-ornithine (HCl). H : l-histidine (HBr). Pr : l-proline. Arg : l-arginine (HCl). Glm : l-glutamine. Hy : l-hydroxyproline. φ-Al : dl-β-phénylalanine. Se : dl-serine. Thr : dl-threonine. Is : dl-isoleucine. Pour les autres détails voir explication de la Fig. 11.

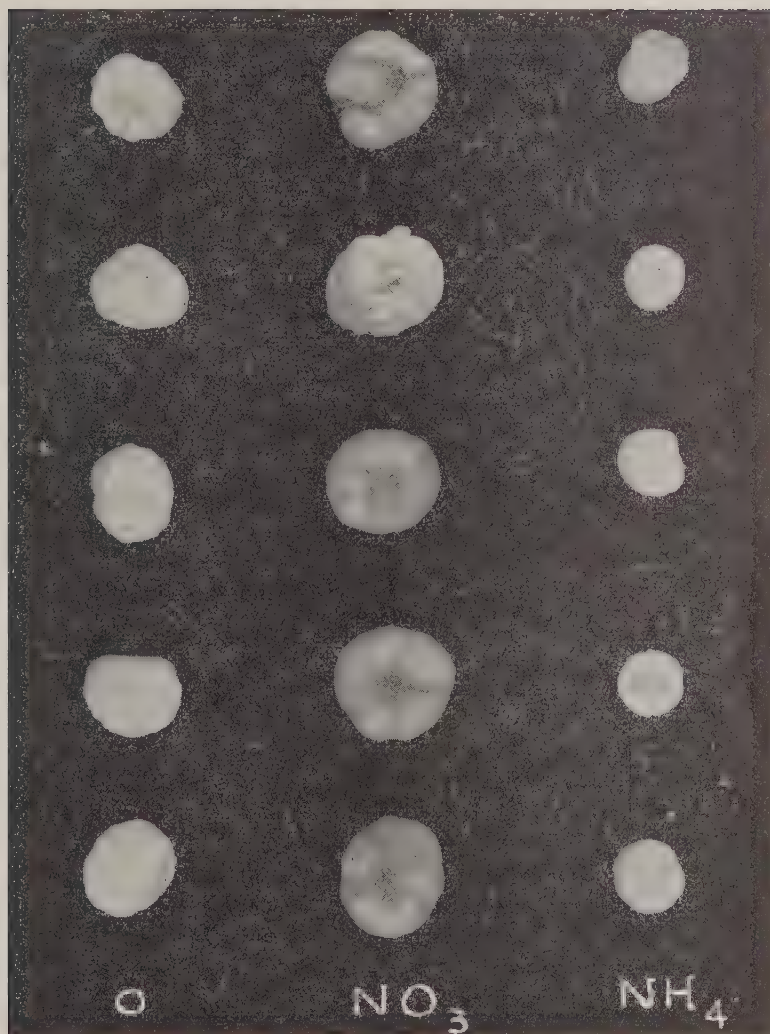


Fig. 13.— Influence de l'ion ammoniacal sur la croissance des tissus d'*Helianthus tuberosus*. O : sans azote. NO_3 : nitrate de sodium (5.4 mM). NH_4 : chlorure d'ammonium (5.4 mM). Le chlorure d'ammonium inhibe même la croissance résiduelle qui se manifeste normalement sur le milieu dépourvu d'azote. Cultures de 45 jours.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le présent travail avait pour but d'examiner l'utilisation des acides aminés, comme source unique d'azote, par les tissus végétaux normaux cultivés *in vitro.*

Le développement des cultures utilisées dans un milieu nutritif contenant, comme source d'azote, du nitrate de sodium à des concentrations différentes montre que l'optimum de la croissance s'obtient, pour les trois types de tissus, (*Salix capraca, Lupinus albus* et *Helianthus tuberosus*) aux doses de 5.4 à 27 mM et qu'à la dose de 135 mM il se manifeste une inhibition ou une action nettement toxique.

Nous avons, de ce fait, considéré comme témoin, pour tous les tissus en question, les cultures se développant sur le milieu contenant 5.4 mM de nitrate (76 mgr. d'azote par litre). Pour pouvoir établir une comparaison entre les résultats des divers cas, nous avons exprimé la croissance en pourcentage de celle observée chez les témoins.

La dose optimum du nitrate, varie naturellement suivant l'espèce des tissus étudiés juqu'à présent. Heller (1953) a trouvé que la dose optimum était pour les tissus normaux de *Dacus carota* 8 mM et pour les tissus de *Parthenocissus tricuspidata* de 4 à 12 mM. Pour les tissus utilisés par nous la limite de la concentration optimum en nitrate atteint 27 mM. Nitsch (1957), d'autre part, note que les tissus d'*Helianthus tuberosus* présentent un développement maximum à la dose de 20 mM, ce qui corrobore nos résultats.

En comparant les données de nos expériences, rassemblées dans les tableaux I, IV, V et VI on constate que parmi les vingt cinq acides aminés utilisés, seul l'acide l-aspartique se montre comme une bonne source d'azote pour tous les trois tissus examinés. La croissance provoquée par cet acide est très comparable ou même égale à celle qui a été obtenue avec le nitrate de sodium.

A une dose d'acide aspartique correspondant à 0.2 mM de $NaNO_3$ la croissance des tissus de *Salix capraea* et d'*Helianthus tuberosus* ne dépasse pas celle observée sur le milieu sans azote. Les tissus de *Lupinus albus* se montrent cependant plus sensibles à cette faible concentration et se développent trois fois plus que sur le milieu privé d'azote.

A la dose de 1 mM le développement des cultures de *Salix capraea* et d'*Helianthus tuberosus* atteint le 50 % de celui du témoin. A la dose de 5.4 mM on a la croissance maximum pour les tissus de *Salix capraea* et *Lupinus albus*, tandis que pour ceux d'*Helianthus tuberosus* le maximum ne s'observe qu'à 27 mM tout en ne dépassant

pas, d'ailleurs, le 76 °/₀ de celui du témoin. Les résultats de Nitsch (1957) corroborent nos résultats, en ce qui concerne les tissus d'*Helianthus tuberosus* bien que la croissance observée par cet auteur soit supérieure à celle que nous avons pu obtenir.

Selon Riker et Gutsche (1948) et Riker et Hildebrandt (1954a, 1954b) l'acide aspartique peut être utilisé par les tissus tumoraux d'*Helianthus annuus*, bien que le rendement soit plutôt maigre (25 °/₀ par rapport au témoin).

Nickell, par ailleurs, (1950, 1954, 1955) ainsi que Nickell et Burkholder (1950) ont trouvé que l'acide en question est le seul qui puisse être utilisé, comme source unique d'azote et d'une manière assez satisfaisante, par les tissus des tumeurs des racines de *Rumex acetosa*.

Les résultats ci-dessus pourraient être rapprochés de ceux de Spoerl (1948) concernant les embryons d'orchidées, cultivés *in vitro*. Il est, d'autre part, à noter que l'acide aspartique se présente comme une bonne source d'azote pour les champignons *Aspergillus niger* (Steinberg 1942), *Sclerotinia sclerotiorum* (Démétriadès 1953) et *Endoconidiophora fagacearum* (Beckman et collab. 1953). Par contre chez *Chlorella vulgaris* l'acide en question ne permet qu'un pauvre développement (Arnow et collab. 1953).

De tous les autres acides aminés utilisés dans nos expériences aucun ne favorise la croissance de tous les trois tissus étudiés.

Ainsi l'asparagine ne permet un développement excellent qu'aux tissus de *Lupinus albus* à la concentration de 1 et 5.4 mM. Avec les tissus de *Salix capraea* cette substance se montre médiocre à la dose de 1 mM et toxique aux doses plus fortes, (5.4 et 27 mM). En ce qui concerne les tissus d'*Helianthus tuberosus* l'asparagine est sans action aux doses de 0.04 à 5.4 mM et toxique à 27 mM.

En comparant ces résultats à ceux obtenus avec des tissus tumoraux on voit que l'asparagine ne permet qu'un faible développement des tissus d'*Helianthus annuus* (Riker et Gutsche 1948), tandis qu'elle est sans action sur les tissus des tumeurs de *Rumex acetosa*.

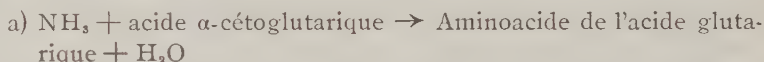
Nitsch (1957) trouve aussi que l'amide en question donne des résultats inférieurs à ceux de l'acide aspartique bien que la croissance soit assez satisfaisante.

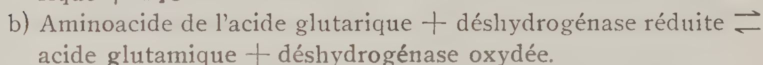
L'asparagine se montre, comme une bonne source d'azote pour *Aspergillus niger* (Steinberg 1937), *Leptomitus lacteus*, *Apodactyla brachynema*, *Penicillium digitatum* (Steinberg 1950) et *Endoconidiophora fagacearum* (Beckman et collab. 1953) et comme assez bonne pour *Sclerotinia sclerotiorum* (Démétriadès 1953).

Dans le cas des tissus de *Salix capraea* et d'*Helianthus tuberosus*, l'acide glutamique ne permet qu'une croissance égale à celle donnée par le milieu sans azote, où se montre toxique. Par contre avec les tissus de *Lupinus albus* et à la concentration de 5.4 mM il provoque une croissance égale à celle du témoin.

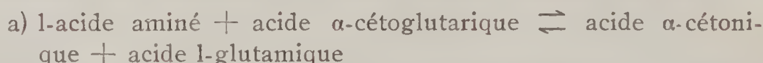
Rappelons que les tissus des tumeurs de *Rumex acetosa* ne se développent point sur un milieu contenant de l'acide glutamique comme seule source d'azote (Nickell et Burkholder 1950). Par contre, Nitsch (1957) a obtenu avec cet acide, et les tissus d'*Helianthus tuberosus*, d'excellents résultats.

Selon nos connaissances actuelles, le système de la déshydrogénase de l'acide glutamique occupe une position prépondérante dans le métabolisme des acides aminés et des hydrates de carbone, et l'acide glutamique est, comme cela se confirme par l'utilisation d'isotopes radioactifs, l'un des premiers acides aminés formés suivant les réactions (Meister 1955):


a) NH_3 + acide α-cétoglutarique → Aminoacide de l'acide glutarique + H_2O


b) Aminoacide de l'acide glutarique + déshydrogénase réduite ⇄ acide glutamique + déshydrogénase oxydée.

L'acide glutamique joue par ailleurs un rôle important pendant le processus de l'oxydation d'un grand nombre d'acides aminés:


a) l-acide aminé + acide α-cétoglutarique ⇄ acide α-cétonique + acide l-glutamique


b) acide l-glutamique + $^1/_2\,O_2$ ⇄ acide α-cétoglutarique + NH_3.

Il serait donc logique de penser que l'acide glutamique peut être favorablement utilisé par tous les tissus cultivés *in vitro*. Néanmoins, les résultats des deux travaux effectués jusqu'à présent sur les tissus tumoraux (Nickell et Burkholder 1950, Frank et collab, 1951) ainsi que nos expériences sur les tissus normaux, montrent que cette présomption et sans fondement. Notons enfin que l'acide en question ne favorise pas le développement des embryons d'orchidées cultivés *in vitro*, bien qu'il n'exerce pas d'action inhibitrice (Spoerl 1948). Il en ressort que l'acide glutamique n'est pas utilisable d'une manière aussi générale que l'acide aspartique.

L'*Arpergillus niger* (Steinberg 1942) et le *Sclerotinia sclerotiorum* (Démétriadès 1953) utilisent néanmoins l'acide glutamique aussi facilement que le nitrate.

Il parait que malgré l'existence de la déshydrogénase de l'acide

glutamique, les différents tissus, de même que divers autres organismes végétaux, réagissent d'une manière différente quant à l'utilisation de cet acide dans le cas où celui-ci est fourni dans le milieu nutritif.

La glutamine ne favorise que la croissance des tissus de *Salix capraea* et de *Lupinus albus*, surtout du premier dont l'augmentation du poids atteint, à la dose de 5.4 mM, 80 % de celle du témoin.

L'arginine est une source excellente d'azote pour les tissus de *Salix capraea* mais médiocre ou acceptable pour les deux autres tissus utilisés. Nos résultats sont sur ce point corroborés par ceux de Nitsch (1957).

Par contre, sur les tissus tumoraux d'*Helianthus annuus* l'arginine n'a qu'une action très médiocre. Elle ne permet, en effet, qu'une croissance égale au 25 % de celle que l'on obtient avec le nitrate de sodium (Riker et Gutsche 1948). La même substance manifeste une faible action sur les tissus des tumeurs de *Rumex acetosa* (Nickell et Burckholder 1950). L'arginine est utilisée d'une manière très satisfaisante par les embryons d'orchidées (Spoerl 1948) et les champignons.

L'histidine paraît être utilisée, d'une manière restreinte, par les tissus d'*Helianthus tuberosus* et à une concentration correspondant à 0.2 mM de nitrate de sodium. La croissance des tissus de *Lupinus albus* n'est pas favorisée par cette substance, bien qu'elle ne soit pas inhibée comme c'est le cas des tissus de *Salix capraea*. L'arginine est, d'autre part, très mal utilisée par les tissus tumoraux (Riker et Gutsche 1948, Nickell et Burkholder 1950) et par certains champignons (Steinberg 1942, Beckman et collab. 1953).

La citrulline permet une certaine croissance (57 %) aux tissus d'*Helianthus tuberosus*, tandis que sur les deux autres tissus étudiés elle exerce une action inhibitrice. Par contre l'ornithine provoque à la dose de 1 mM un développement des tissus de *Salix capraea* seulement, atteignant 50 % du témoin.

La glycine d'autre part, ne favorise légèrement que la croissance des tissus de *Lupinus albus*; elle est très toxique envers les deux autres tissus. Il en est de même de l'α-alanine. Les résultats de Nitsch (1957) montrent, contrairement aux nôtres, que cette dernière substance permet une croissance excellente aux tissus de la souche d'*Helianthus tuberosus* utilisée par lui.

Sur les tissus tumoraux d'*Helianthus annuus* utilisés par Riker et Gutsche la glycine et l'α-alanine exercent une action favorable en permetant une croissance égale respectivement à 50 et 75 %. Par

contre, sur les tissus de *Rumex acetosa* la glycine ne provoque qu'un petit développement et l'α-alanine est toxique.

Tous les autres acides aminés utilisés dans nos expériences sont inutilisables comme sources d'azote. Quelques-uns même sont toxiques et notamment les suivants: β-alanine, isoleucine, serine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane, cysteine et cystine.

Il résulte de ce qui précède que de tous les acides aminés seul l'acide l-aspartique représente une bonne source d'azote pouvant se substituer au nitrate de sodium et être utilisé en général par tous les tissus essayés et aussi par d'autres organismes comme par ex. par les champignons.

Les tissus tumoraux pourtant, du moins ceux qui ont été étudiés jusqu'à présent, bien qu'ils puissent utiliser l'acide aspartique, ne se développent pas aussi bien que les tissus normaux. Ceci pourrait s'expliquer soit par le fait que les tissus tumoraux en question appartiennent à d'autres espèces (*Helianthus annuus, Rumex acetosa*) soit par le caractère particulier du métabolisme des tumeurs. En nous basant sur des résultats que nous avons obtenus avec les tissus tumoraux de *Scorzonera hispanica** nous pensons que la première éventualité semble plus probable.

Enfin nos résultats montrent nettement que le chlorure d'ammonium est une très mauvaise source d'azote pour les trois types de tissus examinés. Des résultats analogues ont été obtenus par Heller (1953) avec les tissus normaux, par Riker et Gutsche (1948) et Burkholder et Nickell (1950) avec des tissus tumoraux.

Nous avons montré que l'action toxique et l'ion ammoniacal ne pouvait pas s'expliquer par l'altération éventuelle du glucose au cours de la stérilisation. D'autre part, cette action défavorable ne pourrait pas être due aux variations du pH (Heller 1953). Le mécanisme de l'action inhibitrice du sel ammoniacal reste donc obscur.

Le fait, toutefois, que les tissus végétaux, cultivés *in vitro*, ne peuvent pas utiliser l'ion ammoniacal, nous conduit à admettre que les acides aminés fournis par le milieu à ces tissus sont absorbés sans désamination préalable. Ceci est confirmé par les expériences de Virtanen et Linkola (1946) effectuées sur des plantules de pois.

On peut conclure de l'exposé ci-dessus que l'utilisation des acides aminés, comme source d'azote, par les tissus végétaux cultivés *in vitro*,

---

* Résultats non publiés. Voir Démétriadès, Ann. de l'Inst. Phytopath Benaki, année 8ème, fasc. 2, 1954, p. 91.

paraît dépendre de l'espèce envisagée. Les généralisations par conséquent sur ce point seraient à éviter et il serait nécessaire d'examiner chaque cas isolément, tant pour les tissus pathologiques que pour les tissus normaux.

L'utilisation néanmoins de l'acide aspartique paraît être générale.

RÉSUMÉ

Les résultats de nos expériences, réalisées sur les cultures des tissus de *Salix capraea*, *Lupinus albus* et *Helianthus tuberosus*, en vue d'examiner la possibilité de l'utilisation des acides aminés, comme source d'azote, peuvent être résumés de la façon suivante:

1. Parmi les vingt cinq acides aminés examinés, seul l'acide l-aspartique peut être utilisé par tous les trois tissus.

2. La dose de l'acide aspartique à laquelle on obtient le maximum de la croissance des cultures est celle qui correspond à 76 mgr. d'azote par litre pour les tissus de *Salix capraea* et *Lupinus albus* et à 380 mgr. d'azote par litre pour *Helianthus tuberosus*.

3. La l-asparagine, l'acide l-glutamique, la l-glutamine et la l-arginine peuvent aussi être utilisées comme sources d'azote, mais non par tous les trois tissus comme c'est le cas avec l'acide l-aspartique.

4. L'asparagine est une source d'azote excellente pour les tissus de *Lupinus albus* mais médiocre pour les tissus de *Salix capraea* et mauvaise pour les tissus d'*Helianthus tuberosus*.

5. L'acide l-glutamique est une bonne source d'azote pour les tissus de *Lupinus albus* mais il est toxique pour les deux autres.

6. La glutamine n'est utilisée que par les tissus de *Salix capraea*; la croissance obtenue est égale à 80 °/₀ de celle du témoin à la même dose de 5.4 mM.

7. L'arginine permet un développement des tissus de *Salix capraea* égal à celui obtenu chez le témoin ($NaNO_3$ 5.4 mM). Cette substance est moins favorable pour les tissus d'*Helianthus tuberosus* et encore moins pour les tissus de *Lupinus albus*.

8. L'histidine provoque un développement moyen (57 °/₀) des tissus d'*Helianthus tuberosus* à une dose correspondant à 15 mgr. d'azote par litre.

9. La citrulline favorise aussi la croissance des tissus d'*Helianthus tuberosus*, qui aux doses de 15 et 76 mgr. d'azote par litre atteint le 57 °/₀ de celle du témoin. Cette substance ne provoque aucune crois-

sance des tissus de *Lupinus albus*; elle est par contre toxique pour ceux de *Salix capraea*.

10. L'ornithine permet, à une dose correspondant à 15 mgr. d'azote par litre, un développement égal au 49°/₀ de celui du témoin, seulement aux tissus de *Salix capraea*. Sur les deux autres tissus cette substance est ni favorable ni inhibitrice.

11. La glycine et la dl-α-alanine ne favorisent que peu la croissance des tissus de *Lupinus albus* (33°/₀ aux doses correspondant à 15 et 76 mgr. d'azote par litre pour la première substance et 3, 15 et 76 mgr. d'azote par litre pour la deuxième). En regard des deux autres tissus utilisés les acides aminés en question sont nettement toxiques.

12. Les acides aminés suivants: β-alanine, dl-valine, l-leucine, l-isoleucine, dl-serine, dl-threonine, dl-β-phénylalanine, l-tyrosine, dl-tryptophane, l-proline, l-hydroxyproline, l-cysteine, l-cystine, dl-méthionine et dl-lysine, ne peuvent pas être utilisés comme source d'azote par les tissus examinés; plusieurs parmi eux exercent une action toxique à une concentration correspondant à 5.4 mM de nitrate de Na.

13. La peptone est une bonne source d'azote pour les tissus de *Lupinus albus* à une dose correspondant à 76 mgr. d'azote par litre; avec les tissus de *Salix capraea* et à la même dose le rendement est médiocre. Pour les tissus d'*Helianthus tuberosus* la peptone n'est pas meilleure que le milieu sans azote.

14. Le nitrate de sodium est, comme il a été démontré à plusieurs reprises, une excellente source d'azote pour tous les tissus cultivés *in vitro*. Pour cette raison nous avons pris la dose de 5.4 mM pour point de comparaison dans toutes les séries de nos expériences.

15. Le chlorure d'ammonium ne peut pas être utilisé comme source d'azote par les tissus examinés. Au contraire, il exerce une action nettement toxique. Il n'y a aucune différence, quant à la croissance obtenue, entre le milieu qui a reçu le chlorure d'ammonium avant la stérilisation et celui auquel ce sel a été ajouté, aseptiquement, après la stérilisation.

BIBLIOGRAPHIE

Appa Rao A., 1956 — The role of pH in nitrogen utilization by Piricularia oryzae. *Experientia* **12**: 215-216 (in *R.A.M.* **35**: 711, 1956).

Arnow P., Oleson J.J. et Williams J.H., 1953 — The effect of arginine on the nutrition of Chlorella vulgaris. *Am. J. Bot.* **40**: 100-104.

Beckman C.H., Kuntz J.E. et Riker A.J., 1953 — The growth of the oak wilt

fungus with various vitamins and carbon and nitrogen sources. *Phytopath.* **43** : 441-447.

BLACK L.M., 1947 — Virus tumors in plants. *Growth (supl.) 6th Growth symposium.*

BRAKKE M.K. et NICKELL L.G., 1955 — Secretion of an enzyme from intact cells of a higher plant tumor. *Ann. Biol.* **31** (Fasc. 1-4) : 215-224.

BURKHOLDER P.R. et NICKELL L.G., 1949 — Atypical growth of plants I. Cultivation of virus tumors of Rumex on nutrient agar. *Bot. Gaz.* **110** : 426-437.

DÉMÉTRIADÈS S.D., 1953 — Études sur la biologie du Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) Massee IV. L'utilisation de diverses sources d'azote. *Ann. de l'Inst. Phytopath. Benaki*, Année 7. Fasc 1.

FRANK E.M., RIKER A.J., et DYE S.L., 1951 — Comparisons of growth by tobacco and sunflower tissue on synthetic media containing various sources of organic nitrogen *Plant Physiol.*, **26** : 258-267.

GAUTHERET R.J., 1935 — Recherches sur la culture des tissus végétaux. Essais de culture de quelques tissus méristématiques. Thèse, Paris.

GAUTHERET R.J., 1942 — Manuel technique de culture des tissus végétaux. Masson, Paris.

GAUTHERET R.J., 1945 — Une voie nouvelle en biologie végétale. La culture des tissus. Gallimard, Paris.

GAUTHERET R.J., 1948 — Sur la culture indéfinie des tissus de Salix capraea. *C. r. Soc. Biol.* **142** : 807-808.

GAUTHERET R.J., 1955 — The nutrition of plant tissue cultures. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* **6** : 433-484.

GUNDERSEN K., 1955 — Effects of B-vitamins and amino-acids on nitrification. *Physiol. Plant.* 8 : 136-141.

HELLER R., 1953 — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse, Paris.

HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1946 — Some common sugars, polysaccharides and organic acids as carbon sources for plant tissue cultures. *Am. J. Bot.* **33** : 229 230 (Abstr.).

HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1947 — Influence of some growth regulating substances on sunflower and tobacco tissue in vitro. *Am. J. Bot.* **34** : 421-427.

HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1949 — The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, Paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue in vitro. *Am. J. Bot.* **36** : 74-85.

HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1950 — Growth of plant tissue in vitro influenced by the concentration of sugars and polysaccharides. *Am. J. Bot.* **37** : 678 (Abst.).

HILDEBRANDT A.C., RIKER A.J. et DUGGAR B.M., 1945 — Growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue with different temperatures, hydrogen ion concentrations and amounts of sugar. *Am. J. Bot.* **32** : 357-361.

HILDEBRANDT A.C., RIKER A.J. et DUGGAR B.M., 1946a — The influence of the composition of the medium on growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue cultures. *Am. J. Bot.* **33** : 591-597.

HILDEBRANDT A.C., RIKER A.J. et DUGGAR B.M., 1946 b — Influence of crown-gall bacterial products, crown-gall tissue extracts and yeast extracts on growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue. *Cancer Res* **6** : 368-377.

HILDEBRANDT A.C., RIKER A.J. et WATERTOR J.L., 1954 — Growth and inhibition of tissue cultures on media with different concentrations of organic acids. *Phytopath.* **44** : 422-428.

HUTCHINSON H.B. et MILLER N.H.J., 1912 — The direct assimilation of inorganic and organic forms of nitrogen by higher plants. *J. Agr. Sci.* **4** : 282-302.

KLEIN G., 1930 — Der Wandel des Stickstoffs in der grünen Pflanze. *Ergebn. Agr. Jahrb. Landw. Chem.* **2** : 143-158.

KLEIN G. et LINSER H., 1932 — Zur Bildung der Betaine und der Alkaloide in der Pflanze I. Die Bildung von Stachydrin und Trigonellin. *Zeitschr. Physiol. Chem.* **209** : 75-96.

KLEIN G. et LINSER H., 1933 — Zur Bildung der Betaine und der Alkaloide in der Pflanze III. Versuche zur Bildung von Nicotin. *Planta.* **20** : 470-475.

LIPMAN J.G., 1912 — The associate growth of legumes and non legumes. *N. J. Agr. Exp. Sta. Bull.* 253.

MEISTER A., 1955 — General reactions of amino acids. In «A Symposium on amino acid metabolism» Edited by W.D. McElroy and H. Bentley Glass, The John Hopkins Press, Baltimore.

MIX A.J., 1953 — Differentiation of species of Taphrina in culture. Utilization of nitrogen compounds. *Mycologia*, **45** : 649-670.

MOREL G., 1950 — Establishment of cultures from different species and their growth on different media. *A.A.A.S. Meeting*, N. York.

NICKELL L.G., 1950 — Effect of aspartic acid on growth of plant virus tumor tissue. *Nature*, **166** : 351-352.

NICKELL L.G., 1954 — Nutritional aspects of virus-tumor growth. *Brookhaven Symposia in Biol.* **6** : 174-184.

NICKELL L.G., 1955 — Nutrition of pathological tissues caused by plants viruses. *Ann. Biol.* **31** : 107-119.

NICKELL L.G. et BURKHOLDER P.R., 1950 — Atypical growth of plants. II. Growth in vitro of virus tumors of Rumex in relation to temperature, pH and various sources of nitrogen, carbon and sulfur. *Am. J. Bot.* **37** : 538-547.

NIGHTINGALE G.T., 1937 — The nitrogen nutrition of green plants. *Bot. Rev.* **3** : 85-174.

NIGHTINGALE G.T., 1948 — The nitrogen nutrition of green plants II. *Bot. Rev.* **14** : 185-221.

NITSCH J.P. et NITSCH COLETTE, 1957 — Auxin dependent growth of excised Helianthus tuberosus tissues II. Organic nitrogenous compounds. *Am. J. Bot.* **44** : 555-564.

PELLETIER R.L. et KEITT G.W., 1953 — Amino acids as nitrogen sources for Venturia inaequalis. *Phytopath.*, **43** ; 481 (Abst.).

PELLETIER R.L. et KEITT G.W., 1954 — Venturia inaequalis (Cke) Wint. VI. Amino acids as sources of nitrogen. *Am. J. Bot.* **41** : 362-371.

PIRSCHLE K., 1929 — Zur Assimilation des Harnstoffs durch die höhere Pflanze. *Biochem. Zeitschr.* **212** : 466-474.

RIKER A.J. et GUTSCHE A.E., 1948 — The growth of sunflower tissue in vitro in synthetic media with various organic and inorganic sources of nitrogen. *Am. J. Bot.* **35** : 227-238.

RIKER A.J. et HILDEBRANDT A.C., 1954 a — Nutrition and diseased plant growth. *Brookhaven Symposia in Biol.* **6** : 79-95.

RIKER A.J. et HILDEBRANDT A.C., 1954 b — The carbon and nitrogen nutrition of gall tissue in culture. *Ann. Biol.* **30** : 283-269.

SCHREINER O. et SKINNER J.J., 1917 — Nitrogenous soil constituents and their bearing on soil fertility. *U.S. Dept. Agr. Bur. Soils. Bull.* 87.

SOSSOUNTZOV I., 1950 a — Le glycocolle comme source d'azote pour la croissance in vitro des prothalles de Gymnogramme calomelanos. *C. r. Soc. Biol.* **144** : 113-115.

SOSSOUNTZOV I., 1950 b — Étude du développement aseptique, sur un milieu à forte concentration en glycocolle, d'une colonie prothallienne de Gymnogramme calomelanos d'un type aberrant. *C. r. Soc. Biol.* **144** : 116-118.

SOSSOUNTZOV I., 1953 — Action du glycocolle sur le développement in vitro des colonies prothalliennes de Gymnogramme calomelanos, Filicinée Polypodiacée I. Morphologie générale et accroissement ponderal des colonies. *Physiol. Plant.* **6** : 723-734.

SOSSOUNTZOV I., 1954 a — Action du glycocolle sur le développement in vitro des colonies prothalliennes de Gymnogramme calomelanos, Filicinée Polypodiacée. II Morphologie générale, sexualité, et dimensions des prothalles constitutifs des colonies prothalliennes. *Physiol. Plant.*, **7** : 1-15.

SOSSOUNTZOV I., 1954 b — Action de quelques acides aminés aliphatiques sur le développement in vitro des colonies prothalliennes de Gymnogramme calomelanos, Filicinée, Polypodiacée. *Physiol. Plant.*, **7** : 383-396.

SOSSOUNTZOV I., 1956 — Le développement in vitro des colonies prothalliennes de Gymnogramme calomelanos (Filicinée, Polypodiacée) en présence de mélanges binaires d'acides aminés aliphatiques. *Physiol. Plant.* **9** : 190-197.

SPOERL E., 1948 — Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *Am. J. Bot.* **35** : 88-95.

STEINBERG R.A., 1937 — Role of molybdenum in the utilization of ammonium and nitrate nitrogen by Aspergillus niger. *J. Agr. Res.* **55** : 891-902.

STEINBERG R.A., 1942 — Effect of trace elements on growth of Aspergillus niger with amino acids *J. Agr. Res.* **64** : 455-475.

STEINBERG R.A., 1950 — Growth of fungi in synthetic nutrient solutions II. *Bot. Rev.* **16** : 208-228.

VIRTANEN A.I. et LINKOLA H., 1946 — Organic nitrogen compounds as nitrogen nutrition for higher plants. *Nature*, **158** : 515.

VIRTANEN A.I., HAUSEN S. et KARSTRÖM H., 1933 — Untersuchungen über die

Leguminose - Bakterien und Pflanzen XII. Die Ausnutzung der aus den Wurzelknolchen der Leguminosen heraus diffundierten Stickstoffverbindungen durch nichtleguminosen. *Biochem. Zeitschr.* **258** : 106-117.

WHITE P.R., 1936 — Plant tissue cultures. *Bot. Rev.* **2**: 419-437.

WHITE P.R., 1939 — Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* **26** : 59-64.

WHITE P.R., 1943 — A handbook of plant tissue culture. The Ronald Press Co., N.Y.

WHITE P.R., 1946 — Plant tissue cultures. *Bot. Rev.* **12** : 521-529.

WHITE P.R., 1951 — Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **2**: 231-244.

WHITE P R., 1954 — The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press Co, N. York.

WHITE P.R. et BRAUN A.C., 1942 — A cancerous neoplasm of plants. Autonomous bacteria-free crown-gall tissue. *Cancer Res.* **2** : 597-617.

WOLF F.T., 1953 — The utilization of carbon and nitrogen compounds by Ustilago zeae. *Mycologia.* **45** : 516-522.

YAMAGUCHI S., 1930 — Studies on the resorption of urea by roots of Zea mays seedlings in sterile culture. *Journ. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Set.* 5, **1**: 37-55

YUKAWA Y. et HUZII S., 1952 — The effects of urea on the growth of Gibberella saubinetti Sacc. and Piricularia oryzae. *Bull. Fac. Agric. Yamaguti Unvi.* **3**: 7-14.

Imprimerie HESTIA